

学位論文の要旨

New Screening Criteria Setting on Evaluation of Cytochrome P450 Induction Using
HepaRG Cells with Multiplex Branched DNA Technologies in Early Drug Discovery.
(HepaRG 細胞と Multiplex Branched DNA 技術を用いた創薬初期段階での Cytochrome P450
誘導能評価系における新規スクリーニング用評価基準の設定)

Akira Ogasawara

小笠原彬

Regeneration Medicine

Yokohama City University Graduate School of Medicine

横浜市立大学 大学院医学研究科 臓器再生医学

(Doctoral Supervisor : Hideki Taniguchi, Professor)

(指導教員：谷口 英樹 教授)

学位論文の要旨

New Screening Criteria Setting on Evaluation of Cytochrome P450 Induction Using HepaRG Cells with Multiplex Branched DNA Technologies in Early Drug Discovery.
(HepaRG 細胞と Multiplex Branched DNA 技術を用いた創薬初期段階での Cytochrome P450 誘導能評価系における新規スクリーニング用評価基準の設定)

<http://www.eurekaselect.com/144973/article>

<http://www.eurekaselect.com/159200/article>

◇◇◇◇ 本文

1. 序論

Cytochrome P450 (CYP)は主要な薬物代謝酵素として知られており、その阻害や誘導は薬物相互作用 (drug-drug interactions : DDIs) の主要因であることが広く知られている。創薬開発コストの低減およびスピードアップのためには、創薬の早期段階において新薬候補化合物の CYP に対する作用を評価する事が重要である。また、近年 induced pluripotent stem (iPS) cells 由来肝細胞から肝臓原基が作られ (Takebe et al., 2013), 再生医療等への応用が期待されているが、こうした場合においても「どの程度ヒトの肝臓に近い性質を有しているか」を確認するために、CYP に対して作用する化合物を複数評価する必要がある。そのため、創薬および再生医療の両分野において高スループットで信頼性の高い CYP 機能評価系の構築が欠かせないと考えられる。

現在、製薬企業ではマイクロソームを用いたハイスループットな CYP 阻害評価試験系が構築されている (Kozakai et al., 2012 ; Kozakai et al., 2014)。一方、CYP 誘導評価に関しては、入手困難で高価なヒト肝細胞を必要とする試験系しか存在しないために、スクリーニング系構築が遅れているのが現状である。薬物の反復投与による CYP の自己代謝酵素誘導は新薬開発プロジェクトの中止に繋がりうることから、創薬初期段階での CYP 誘導能の HTS 系の確立が望まれていた (太田, 2011)。そのような状況下において、CYP などの様々な薬物代謝機能が初代ヒト肝細胞に近い特性を持つとされる HepaRG 細胞の樹立が報告された (Andersson et al., 2012)。HepaRG 細胞は一人のドナー由来の細胞であるため、ヒト肝細胞のような薬物代謝酵素機能の大きな個体差の影響がなく、長期にわたる創薬スクリーニングでもバッチ間差が少ないことが報告されている。そこで我々は安価で安定供給が可能な HepaRG 細胞を用いた創薬初期段階における CYP 誘導能スクリーニング系構築に着手した。

なお、ヒト肝細胞を用いた従来の CYP 誘導評価系では酵素活性がエンドポイントとして採用されることが多かったが、Fahmi et al. (2010) が「mRNA の方がエンドポイントとして適している」という趣旨の論文を発表したことを受けて、Food and Drug Administration (FDA), European Medicines Agency (EMA) および日本の厚生労働省 (MHLW) の薬物相互作用ガイドラインでも mRNA 評価を推奨するようになってきている。そこで、今回の検討では、HepaRG 細胞を用いた場合に、酵素活性と mRNA のどちらで CYP 誘導能を評価すべきかについても検討した。

2. 実験材料と方法

・細胞

HepaRG 細胞およびその亜株 (HepaRG 5F control cells, PXR-knockout (KO) HepaRG cells) と凍結ヒト凍結肝細胞を用いた。HepaRG 細胞は KAC Co., Ltd. (Kyoto, Japan) または Oriental Yeast Co., Ltd. (Tokyo, Japan) より購入した。HepaRG 細胞の亜株は Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) より購入した。凍結ヒト凍結肝細胞は Sekisui Medical Co., Ltd. (Tokyo, Japan) および BioreclamationIVT (Westbury, NY) より購入した。

・評価対象 CYP 分子種とその典型的誘導剤

評価分子種としては CYP1A2, CYP2B6, CYP3A4 を採用し、各分子種に対する典型的誘導剤 (positive control) として omeprazole (OME), phenobarbital (PB), rifampicin (RIF) を用いた。

・細胞培養と誘導剤暴露

HepaRG 細胞を 72,000 cells/well となるよう type 1 collagen-coated 96-well plate に播種した。細胞播種から 3 日後に、DMSO 溶媒で希釈された誘導能評価用検体を培地に 1000 倍希釈し (0.1% DMSO, v/v), 細胞に暴露した。24 時間後、新しい検体含有培地を再び細胞に暴露させ、更に 24 時間インキュベートした。

・ mRNA 評価

QuantiGene Plex 2.0 Assay を用い、各 CYP の mRNA を評価した。

・酵素活性評価

カクテルプローブ基質 (40 μ M phenacetin, 50 μ M bupropion, 5 μ M midazolam) と

UPLC-MS/MS を用い、CYP1A2, CYP2B6, CYP3A4 の酵素活性を評価した。CYP1A2 は phenacetin *O*-deethylation (PHOD) 活性に伴う acetaminophen, CYP2B6 は bupropion hydroxylation (BPOH) 活性に伴う hydroxybupropion, CYP3A4 は midazolam hydroxylation (MDOH) 活性に伴う 1'-hydroxymidazolam の産生量を酵素活性マーカーとして評価した。

- ・タンパク定量

Trypsin 消化した後に、各 CYP に特異性の高いペプチド断片 (CYP1A2 : YLPNPALQR, CYP3A4/43 : LQEEIDAVLPNK) を UPLC-MS/MS を用いて評価した。

- ・細胞毒性

培養上清中の LDH 量を測定することで毒性を評価した。

3. 結果と考察

凍結ヒト肝細胞を用いて、各 CYP 分子種に対する positive control である OME, PB および RIF の誘導能について、mRNA レベルと酵素活性間での誘導能の比較検討を行った結果、各誘導剤において期待される分子種の誘導が確認された。一方 HepaRG 細胞に関しては、mRNA レベルでの評価は凍結ヒト肝細胞と概ね同様の傾向を示したが、酵素活性評価においては、CYP2B6 および CYP3A4 のそれぞれの positive control である PB および RIF によって、PHOD 活性 (CYP1A2 酵素活性マーカー) も著しく上昇し、mRNA レベルでの評価と酵素活性評価の間で乖離が認められた。

PHOD 活性には CYP3A が微かに寄与していることが報告されており (Kobayashi et al., 1999; Nakajima et al., 1999), HepaRG 細胞では PB あるいは RIF によって誘導された CYP3A4 が PHOD 活性に影響を及ぼしている可能性が示唆された。そこで、HepaRG 細胞の CYP1A2 および CYP3A4 タンパク質の発現量に注目し、凍結ヒト肝細胞と比較検討した。HepaRG 細胞の CYP1A2 タンパク質発現量はヒト凍結肝細胞に比べて著しく低く 1/30 以下に過ぎなかったのに対し、CYP3A4 タンパク質の発現量は両者で同程度の 0.8~3 倍程度であった。続いて、CYP3A4 の特異的阻害剤であるケトコナゾールを用い、PB あるいは RIF を暴露した HepaRG 細胞における PHOD 活性が、ケトコナゾールの暴露濃度に応じて強く阻害されることを確認した。また、CYP3A4 の転写活性に関わる PXR をノックアウトした PXR-KO HepaRG 細胞では、PB および RIF による PHOD 活性の誘導はほとんど認められなかった。これらの結果より、PB あるいは RIF を暴露された HepaRG 細胞では、誘導された CYP3A4 による触媒が PHOD 活性に大きく寄与していると結論付けた。以上より HepaRG 細胞を用

いた CYP 誘導評価系のエンドポイントは、酵素活性ではなく mRNA レベルの評価が適切であると判断した。

次に、mRNA をエンドポイントとした評価系でのスクリーニング判定基準の検討を行った。ヒト肝細胞で誘導能が知られている複数の化合物群について評価をしたところ、positive control の誘導倍率に対する被験薬物の誘導倍率の相対比率（% of positive control）が 10% を超えるか否かで各分子種の誘導ポテンシャルを概ね正しく評価できることが分かった。そこで、% of positive control が 10% に達するときの化合物濃度を R_{10} 値と定め、この値がスクリーニング系における誘導能評価の判定基準（クライテリア）として有用であると判断した。また、ランダムな構造を有する低分子化合物 109 検体について、CYP 誘導能評価スクリーニングを実施した結果、CYP3A4 に加えて CYP1A2 あるいは CYP2B6 のみを単独で誘導する検体も複数存在していることが明らかになり、創薬の初期段階において CYP3 分子種を同時に評価することの有用性も示唆された。

.....◇◇◇◇

引用文献

- [1] Andersson, T. B., Kanebratt, K. P., and Kenna, J. G. (2012), The HepaRG cell line: a unique in vitro tool for understanding drug metabolism and toxicology in human, *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 8, 909-920.
- [2] Fahmi, O. A., Kish, M., Boldt, S., and Obach, R. S. (2010), Cytochrome P450 3A4 mRNA is a more reliable marker than CYP3A4 activity for detecting pregnane X receptor-activated induction of drug-metabolizing enzymes, *Drug Metab Dispos*, 38, 1605-1611.
- [3] Kobayashi, K., Nakajima, M., Oshima, K., Shimada, N., Yokoi, T., and Chiba, K. (1999), Involvement of CYP2E1 as a low-affinity enzyme in phenacetin *O*-deethylation in human liver microsomes, *Drug Metab Dispos*, 27, 860-865.
- [4] Kozakai, K., Yamada, Y., Oshikata, M., Kawase, T., Suzuki, E., Haramaki, Y., and Taniguchi, H. (2012), Reliable high-throughput method for inhibition assay of 8 cytochrome P450 isoforms using cocktail of probe substrates and stable isotope-labeled internal standards, *Drug Metab Pharmacokinet*, 27, 520-529.
- [5] Kozakai, K., Yamada, Y., Oshikata, M., Kawase, T., Suzuki, E., Haramaki, Y., and Taniguchi, H. (2014), Cocktail-substrate approach-based high-throughput assay for evaluation of direct and time-dependent inhibition of multiple cytochrome P450 isoforms, *Drug Metab Pharmacokinet*, 29, 198-207
- [6] Nakajima, M., Kobayashi, K., Oshima, K., Shimada, N., Tokudome, S., Chiba, K., and Yokoi, T. (1999), Activation of phenacetin *O*-deethylase activity by alpha-naphthoflavone in human liver microsomes, *Xenobiotica*, 29, 885-898.
- [7] 太田之弘 (2011). 創薬における薬物による CYP 誘導評価, 社団法人 日本薬理学会 (編集). 実験薬理学 創薬研究のストラテジー 上, 金芳堂, 京都, 第 3 章
- [8] Takebe, T., Sekine, K., Enomura, M., Koike, H., Kimura, M., Ogaeri, T., Zhang, R. R., Ueno, Y.,

Zheng, Y. W., Koike, N., Aoyama, S., Adachi, Y., and Taniguchi, H. (2013), Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant, *Nature*, 499, 481-484.

論文目録

I 主論文

New Screening Criteria Setting on Evaluation of Cytochrome P450 Induction Using HepaRG Cells with Multiplex Branched DNA Technologies in Early Drug Discovery.

Ogasawara, A., Torimoto, N., Tsuda, N., Aohara, F., Ohashi, R., Yamada, Y., Taniguchi, H:
Drug Metab Lett. Vol.10, No.3, Page 152-160, 2016

II 副論文

Cytochrome P450 1A2 Messenger RNA is a More Reliable Marker than Cytochrome P450 1A2 Activity, Phenacetin *O*-Deethylation, for Assessment of Induction Potential of Drug-Metabolizing Enzymes Using HepaRG Cells.

Ogasawara, A., Kato, N., Torimoto, N., Aohara, F., Ohashi, R., Yamada, Y., Taniguchi, H:
Drug Metab Lett. Vol.12, No.1, Page 14-23, 2018